

Maisons-Alfort, le 11 décembre 2000

LE DIRECTEUR GÉNÉRAL

AVIS

Saisine n° 2000-SA-0250

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif au rapport d'évaluation initiale réalisé par le Royaume-Uni au sujet d'un nouvel ingrédient, le tréhalose

L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a été saisie le 17 octobre 2000 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, d'une demande d'avis relative au rapport d'évaluation initiale réalisé par le Royaume-Uni au sujet d'un nouvel ingrédient, le tréhalose. Ce dernier a été identifié comme appartenant à la classe 6 : aliment produit par un procédé nouveau selon le règlement CE 258/97 relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients alimentaires.

Après consultation des comités d'experts spécialisés « Nutrition humaine » le 15 novembre 2000, « Biotechnologie » le 23 novembre 2000 et « Additifs, arômes et auxiliaires technologiques » le 5 décembre 2000, l'Afssa émet l'avis suivant :

Considérant que le tréhalose est un disaccharide non réducteur constitué de deux molécules de glucose liées par une liaison α -1-1 glucosidique, naturellement présent dans l'hémolymphe des insectes et en petites quantités dans certains champignons, les levures (et vraisemblablement dans le pain et les boissons fermentées) et le miel ;

Considérant que le pétitionnaire présente le dossier comme relatif à un nouveau procédé de fabrication d'un ingrédient déjà autorisé ; considérant que le Royaume-Uni a donné en 1991 une autorisation d'emploi pour l'utilisation du tréhalose (obtenu selon un procédé différent du procédé objet de la demande) pour la stabilisation de certains aliments pendant les procédés de séchage et de réhydratation (lait en poudre, soupe sèche) et pour un usage alimentaire ; considérant que cette autorisation semble n'avoir été suivie d'aucune utilisation (il n'en est pas fait mention dans le rapport d'évaluation) ;

Considérant que du point de vue technologique, le tréhalose en solution aqueuse à des concentrations entre 10 et 34% (P/V) a un pouvoir sucrant inférieur de l'ordre de 40 à 45% à celui du saccharose ; considérant que son hygroscopicité, sa stabilité chimique, sa stabilité thermique, sa résistance à l'hydrolyse catalysée en milieu acide (réaction de Maillard) font de ce glucide une substance technologiquement intéressante en tant que produit de remplacement du saccharose ;

Considérant que le procédé de fabrication du tréhalose proposé met en œuvre les sept enzymes suivantes :

- α -amylase de *Bacillus licheniformis*,
- maltooligosyl tréhalose synthase (MTSase) et maltooligosyl tréhalose tréhalohydrolase (MTTase) d'*Arthrobacter ramosus*,
- cyclodextrine glucanotransférase (CGTase) de *Bacillus stearothermophilus*,
- isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata*,
- glucoamylase d'*Aspergillus niger*,
- α -amylase de *Bacillus subtilis* ;

23, avenue du
Général de Gaulle
BP 19, 94701
Maisons-Alfort cedex
Tel 01 49 77 13 00
Fax 01 49 77 90 05
www.afssa.fr

Considérant que trois de ces préparations enzymatiques (α -amylase de *Bacillus licheniformis*, glucoamylase d'*Aspergillus niger*, α -amylase de *Bacillus subtilis*) sont déjà autorisées en France (arrêté du 5 septembre 1989 relatif à l'emploi de préparations enzymatiques dans la fabrication de certaines denrées et boissons destinées à l'alimentation humaine) ; considérant que quatre autres préparations enzymatiques, MTSase et MTTase d'*Arthrobacter ramosus*, CGTase de *Bacillus stearothermophilus* et isoamylase de *Pseudomonas amyloclavata*, n'ont été ni évaluées ni autorisées en France ; considérant que dans la présente demande, seules les préparations enzymatiques MTSases et MTTases ont fait l'objet d'une étude de mutagenèse (test d'Ames) et d'une étude de toxicité aiguë ;

Considérant qu'il est revendiqué une pureté minimale du tréhalose de 98% en faisant appel à une méthode de dosage par HPLC ; considérant que les impuretés glycosidiques ont été estimées à moins de 1% pour du tréhalose à 99,1% de pureté ; mais qu'aucune limite maximale de ces impuretés glycosidiques n'est proposée pour du tréhalose à 98% de pureté ; considérant qu'il existe une différence entre les spécifications du contrôle et les résultats des analyses de la solution aqueuse ;

Considérant que la différence de pureté observée entre le produit utilisé dans les études toxicologiques (99%) et celle du produit commercial (supérieure ou égale à 98%) est principalement liée à la présence du glucose (0,5%), aux dérivés du maltose (0,3%) et aux dérivés d'isomaltose (0,1%) ; considérant que le Royaume-Uni accepte cette analogie de pureté et indique qu'elle n'entraîne pas de modifications dans l'évaluation du risque toxicologique ;

Considérant que les recherches de bactéries sporulées (notamment les *Bacillus*), d'activités enzymatiques résiduelles et de protéines enzymatiques éventuellement dénaturées n'ont pas été effectuées dans le produit fini ;

Considérant que le pétitionnaire revendique que le tréhalose fabriqué selon le nouveau procédé est chimiquement identique à celui fabriqué par le procédé autorisé au Royaume-Uni, mais qu'il n'a pas fourni de données chiffrées prouvant cette analogie ;

Considérant que l'étude de toxicité répétée pendant 13 semaines chez la souris, menée selon les lignes directrices de l'OCDE et les bonnes pratiques de laboratoire, n'a pas montré d'effet secondaire réducteur aux doses de 0 ; 0,5 ; 1,5 ou 5% de tréhalose dans le régime alimentaire (correspondant respectivement à 0, 840, 2500 et 8300 mg/kg p.c./jour) ; considérant que les animaux mâles montrent, dès le début de l'étude, une réduction significative de la consommation alimentaire à la dose moyenne et à la dose la plus forte ; considérant que des modifications occasionnelles sont rapportées sur les paramètres plasmatiques (augmentation du glucose, baisse de calcium et de potassium, augmentation du phosphore) et les paramètres métaboliques (retard de croissance) ; considérant que les autres paramètres retenus dans cette étude ne montrent pas de différence entre les animaux traités et témoins ; considérant en conséquence qu'il semble prudent de retenir la dose moyenne comme dose sans effet (DSE), soit 2500 mg/kg p.c./jour ;

Considérant que le dossier du pétitionnaire mentionne deux études de toxicité répétée pendant 14 jours chez la souris et chez le chien ; considérant que le rapport n'en a pas fait mention ; considérant qu'il serait judicieux de rapporter ces deux études pour, d'une part s'assurer qu'il n'existe pas d'effets secondaires autres que ceux observés dans l'étude de toxicité répétée de 13 semaines et d'autre part, pour faire état de la présence d'une étude chez une seconde espèce (le chien) conformément à la réglementation en cours ;

Considérant que l'étude de reproduction sur deux générations chez le rat, menée selon les lignes directrices de l'OCDE et les bonnes pratiques de laboratoire, n'a pas montré d'effet secondaire réducteur sur les paramètres de reproduction aux doses de 0 ; 2,5 ; 5 ou 10% de tréhalose dans le régime alimentaire ; considérant que la DSE de 6000 mg/kg p.c./ jour peut être acceptée sous réserve de la clarification des variations de la consommation alimentaire observée chez les animaux traités ; Considérant que les études de reproduction y compris la tératogenèse chez le lapin et chez le rat, menées selon les lignes directrices de l'OCDE et les bonnes pratiques de laboratoire, n'ont pas montré d'effet maternotoxique, ni embryotoxique ni foetotoxique aux doses de 0 ; 2,5% ; 5% et 10% de tréhalose dans le régime alimentaire ; considérant que les DSE retenues sont respectivement de 2000 et 6900 mg/kg p.c./jour pour le lapin et pour le rat ;

Considérant que le test de mutation génique chez les procaryotes (test d'Ames), le test d'aberrations chromosomiques dans les cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) et le test du micronoyau dans la moelle osseuse de la souris montrent des résultats négatifs dans les conditions expérimentales de ces études et indiquent l'absence d'effet mutagène du tréhalose ;

Considérant que chez l'homme, le tréhalose est rapidement hydrolysé en deux molécules de glucose par une tréhalase situé au niveau de la bordure en brosse de l'intestin grêle ; considérant que des cas de déficience en tréhalase correspondent à 1% de la population (si l'on excepte les populations du Groenland où cette prévalence est plus élevée) ont été observés ; considérant que la prévalence de la déficience en tréhalase semble plus faible que celle de la déficience en lactase ; considérant qu'une consommation moyenne de 8 g/jour (19 g/jour pour les plus forts consommateurs ; 90^{ème} percentile) apparaît bien tolérée ;

Considérant que les études cliniques réalisées chez plus de 100 personnes ayant ingéré jusqu'à 30 g/jour de tréhalose n'ont montré aucune manifestation gastro-intestinale ; considérant que les effets secondaires observés (inconfort intestinal : flatulences, distension, diarrhée ou effet laxatif ...) apparaissent après ingestion de doses supérieures à 30 g/jour de tréhalose chez des sujets sensibles (probablement, mais sans doute pas exclusivement, résultant de l'activité osmotique du tréhalose non digéré dans le tube digestif) ;

Considérant que les doses d'utilisation revendiquées (3,9 à 8 g/jour en consommation moyenne) reposent sur des études de simulation de la consommation qui ne reflètent pas la consommation réelle des pays européens ; considérant que la marge de sécurité de 60 avancée dans le rapport d'évaluation ne peut en conséquence être retenue ;

Considérant que le consommateur doit être informé de la présence de tréhalose dans l'aliment (comme source de glucose, source d'énergie, et en cas de déficience en tréhalase) ; considérant que l'information du consommateur diabétique est indispensable ;

Des compléments d'information devraient être apportés sur les points suivants :

1. Fournir des études toxicologiques appropriées démontrant l'innocuité des enzymes CGTase de *Bacillus stearothermophilus*, MTTase et MTSase d'*Arthrobacter ramosus*, ainsi que celle des souches bactériennes d'*Arthrobacter ramosus* et de *Pseudomonas amyloclavata*. Détailler l'utilisation de chaque enzyme dans le procédé de fabrication.
2. Compléter les spécifications du tréhalose suivantes : aspect, coloration, limite en arsenic, pH en solution. Indiquer une limite maximale pour les substances glycosidiques pour un produit de pureté commerciale, avec mention de la méthode de quantification validée. Fournir des analyses de lot pour la totalité des spécifications de contrôle retenues. Fournir des informations concernant l'hygroscopicité de la forme dihydrate du tréhalose. Présenter les résultats comparatifs des analyses physico-chimiques permettant de justifier l'analogie du tréhalose obtenu selon les deux procédés de fabrication.
3. Fournir les résultats de recherche de bactéries sporulées, activités enzymatiques résiduelles, présence de protéines enzymatiques dénaturées.....
4. Intégrer dans le rapport d'évaluation, les études de toxicité répétée sur 14 jours chez la souris et chez le chien.
5. Fournir des comparaisons (bibliographique ou expérimentale), avec des quantités isomoléculaires de maltose pour vérifier si les effets observés dans les essais de tolérance clinique sont dus à une charge (ou une surcharge) physiologique de glucose ou de tréhalose non digéré.
6. Fournir des renseignements précis sur les utilisations envisagées du tréhalose (boissons etc....), permettant de valider les estimations de consommation et d'exposition pour les pays européens.

En cas de dépassement des doses testées dans les essais cliniques fournis dans le présent dossier, il conviendrait de présenter des essais cliniques supplémentaires pour démontrer la tolérance aux doses envisagées

7. Enfin, il est suggéré que la mention « le tréhalose contient du glucose » figure sur l'étiquetage, portant ainsi une information claire et compréhensible pour le consommateur en général et pour le diabétique en particulier.

Le Directeur général de l'Agence française
de sécurité sanitaire des aliments

Martin HIRSCH